

Année 1962

399

T H E S E
pour le
DOCTORAT en MEDECINE
(Diplôme d'Etat)

par

CLOAREC Lise,
né le, 8 Avril 1932 à Dompierre
sur Yon (Vendée)

Présentée et soutenue publiquement le 1962

COMPARAISON de L'HAPTOGLOBINE
des SUJETS CANCEREUX à L'HAPTO-
GLOBINE des SUJETS NORMAUX.

Président : Mr le Professeur M.F. JAYLE.

FACULTE de MEDECINE de PARIS

Année 1962

N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT en MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

CLOAREC Lise,

né le, 8 Avril 1932 à Dompierre

sur Yon (Vendée)

Présentée et soutenue publiquement le 1962

COMPARAISON de L'HAPTOGLOBINE
des SUJETS CANCEREUX à L'HAPTO-
GLOBINE des SUJETS NORMAUX.

Président : Mr le Professeur M.F JAYLE



1.10.1960

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Aubin (A.), Bénard (H.), Bulliard (H.), Cadenat (F.), Chabrol (E.),
Champy (C.), Debré (R.), Gastinel (P.), Guillaïn (G.), Halphen (E.),
Hazard (R.), Heuyer (G.), Lantuejoul (P.), Laroche (G.), Lévy-Solal (E.),
Lian (C.), Loeper (M.), Marion (G.), Mathieu (P.), Mocquot (P.),
Mondor (H.), Monod (R.), Moreau (R.), Olivier (E.), Pasteur Vallery-Radot,
Petit-Dutaillis, Richet (C.), Strohl (A.), Tanon (L.).

DOYEN..... Léon BINET
Membre de l'Institut

ASSEESSEUR..... Jean VERNE.

I. -- PROFESSEURS

M. M.

Anatomie.....	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique.....	DELARUE (J.)
Anesthésiologie.....	BAUMANN (J.)
Biochimie médicale.....	JAYLE (M. F.)
" " (Professeur à titre personnel).....	ETTORI (J.)
" " (Professeur à titre personnel).....	SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports.....	Challey-Bert (P.)
Biologie médicale.....	FAUVERT (R.)
" " (Professeur à titre personnel).....	BOURLIERE (F.)
Cancérologie médicale et sociale.....	BERNARD (J.)
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker).....	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais).....	MOUQUIN (M.)
Beaujon.....	SICARD (A.)
Cochin.....	N.
Hôtel-Dieu.....	PATEL (J.)
Cliniques chirurgicales Pitié.....	CORDIER (G.)
Saint-Antoine.....	GOSSET (J.)
Salpêtrière.....	Moulonguet (P.)
Tenon.....	Lortat-Jacob (J. L.)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550221_0017

clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades).....	FEVRE (M.)
clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin).....	Merlé d'Aubigné (R.)
clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais).....	Gaudart-d'Allaines (F. de)
clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laënnec).....	MATHEY (J.)
clinique endocrinologique (Pitié).....	DECOURT (J.)
clinique de génétique médicale (Enfants-Malades).....	LAMY (M.)
clinique de gynécologique (Broca).....	Funck - Brentano (P.)
clinique des maladies cutanées et syphilitiques (St-Louis).....	DEGOS (R.)
clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades).....	CATHALA (J.)
clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard).....	MOLLARET (P.)
clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Ste-Anne).....	DELAY (J.)
clinique des maladies métaboliques (Necker).....	HAMBURGER (J.)
clinique des maladies du sang (Broussais).....	MARCHAL (G.)
clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière).....	N.
Boucicaut.....	LENEGRE (J.)
Broussais.....	SOULIE (P.)
Cochin.....	Justin-Besançon (L.)
Cochin.....	BROUET (G.)
Hôtel-Dieu.....	BARIETY (M.)
Pitié.....	DREYFUS (G.)
St-Antoine.....	KOURILSKY (R.)
clinique médicale d'hydrologie thérapeutique et climatologie (Bichat)...	DEBRAY (C.)
clinique médicale propédeutique (Broussais).....	GENNES (L. de)
clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la	
nutrition (Hôtel Dieu).....	DEROT (M.)
clinique de neuro-chirurgie (Pitié).....	DAVID (M.)
clinique neurologique (Salpêtrière).....	GARCIN (R.)
Baudelocque	LACOMME (M.)
cliniques obstétricales.....	Fosch (Suresnes).....
Fosch (Suresnes).....	MERGER (R.)
cliniques obstétricales et gynécologique (Port-Royal).....	VARANGOT (J.)

Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu).....	RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière).....	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (St-Vincent de Paul).....	LELONG (M.)
Clinique de pédiatrie Sociale (Enfants-Malades).....	MARIE (J.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laënnec).....	BERNARD (E.)
Clinique psychiatrique infantile (Salpêtrière).....	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin).....	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié).....	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard).....	N.
Clinique thérapeutique médicale (St-Antoine).....	LEMAIRE (A.)
Clinique urologique (Cochin).....	N.
Embryologie.....	GIROUD (A.)
" (Professeur à titre personnel).....	Tuchmann-Duplessis (H.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière).....	SEZE (S. de)
Histologie.....	VERNE (J.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau).....	TURPIN (R.)
Hygiène et médecine préventive.....	JOANNON (P.)
" (Professeur à titre personnel).....	DEPARIS (M.)
Médecine du Travail.....	DESOILLE (H.)
Médecine légale.....	Piédelièvre (R.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie).....	FASQUELLE (R.)
Parasitologie.....	GALLIARD (H.)
" (Professeur à titre personnel).....	BRUMPT (L. C.)
Pathologie chirurgicale.....	COUVELAIRE (R.)
" (Professeur à titre personnel).....	LAURANCE (G.)
Pathologie exotique.....	LAVIER (G.)
Pathologie expérimentale et comparée.....	MERKLEN (F. P.)
Pathologie médicale.....	MILLIEZ (P.)
Pathologie respiratoire.....	TURIAF (F.)

Pathologie et thérapeutique générales.....	BOUDIN (J.)
Pharmacologie.....	CHEYMOL (J.)
" (Professeur à titre personnel).....	LEVY (Mlle J.)
Physiologie.....	BINET (L.)
" (Professeur à titre personnel).....	BARGETON (D.)
" (Professeur à titre personnel).....	PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétricale.....	LEPAGE (F.)
Physique médicale.....	DOGNON (A.)
" (Professeur à titre personnel).....	DJOURNO (A.)
Radiologie Médicale.....	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale.....	LEGER (L.)
Thérapeutique.....	CONTE (M.)

II. --PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS
AGREGES ET MAITRES DE CONFERENCES --AGREGES

ANATOMIE	CABROL (C.)	Ophtalmologie.....	BREGEAT (P.)
	COUINAUD (C.)		SARAUX (H.)
	OLIVIER (G.)	Orthopédie.....	JUDET (R.)
	Gauthier-Villars (Mlle P.)		RAMADIER (J.)
	(pr. s. ch.)	Oto-rhino-Laryngologie	DEBAIN (J.)
Anatomie Pathologique	BUSSER	Parasitologie.....	CHABAUD (A.)
	GOUYGOU (Ch.)		BARCAT (J.)
	ORCEL (L.)		BINET (J. P.)
	PAILLAS (J.)		CAUCHOIX (J.)
			CHATELIN (C. L.)
Anesthésiologie.....	VOURC'H (G.)		DUBOST (Ch.)
			DUBOST (Cl.)
Bactériologie.....	BARBIER (P.)	Pathologie chirurgicale	FAUREL (J.)
	CHRISTOL (D.)		FLABEAU (F.)
			GERMAIN (A.)
	TOURNIER (P.)		LOYGUE (J.)
			MERCADIER
Biochimie médicale	Desgrez (P.) pr s ch.		PERROTIN (J.)
	Polonoski (J.) m; conf.		ROBERT (H.)
			THOMERET (G.)

Biologie appliquée à l'Education		Pathologie exotique	SCHNEIDER (J.)
Physique et aux Sports	PLAS (F.)		CROSNIER (J.)
Carcinologie	DENOIX (P.)		HARTMANN (L.)
	MATHE (G.)	Pathologie	LOEPER (J.)
Dermato-Syphiligraphie	DUPERRAT(B.)		MAURICE (J.)
Electro-Radiologie.....	Ledoux-Lebard(G.)	Expérimentale	RICHET (G.)
Hématologie.....	Bilski-Pasquier (G.)		AUSSANNAIRE (M.)
	DAUSSET (J.)		BOUR (H.)
	Coujard (R.) pr s ch		BOUVIER (J.)
Histologie.....	MAROIS (M.)		BOUVRAIN (Y.)
	RACADOT (J.)		BRICAIRE (H.)
Hydrologie.....	CORNET (A.)		BRISSAUD (H.)
Hygiène.....	BOYER (J.) pr s ch		BROCARD (H.)
	Corre-Hurst (Mme L.)		BUGE (A.)
Maladies infectieuses	BASTIN (R.)		Castaigne (P) m conf
	DUPONT (V.)		CATINAT (J.)
	Derobert (L;) pro s ch		CONTAMIN (F.)
	HADENGUE (A.)		COURY (C.)
Médecine légale.....	FOURNIER (E.)	Pathologie médicale	FREZAL (J.)
	GUENIOT (M.)		HOUSSET (E.)
Médecine du travail.....	ALBAHARY (C.)		LAROCHE (Cl.)
Neurologie.....	LHERMITTE (F.)		LESOBRE (R.)
	GRANJON (A.)		MACREZ (C.)
	HERVET (E.)		NICK (J.)
	LE LORIER (G.)		Pequignot (H) pr s ch
Obstétrique.....	MORIN (P.)		ROYER (P.)
	MUSSET (R.)		WOLFROMM (R.)
	ROBEY (M.)		
	Thoyer Rozat (J.)		

	JOSEPH (R.)	Pneumo phtisiologie.....	KREIS (B.)
	MANDE (R.)	Psychiatrie.....	PICHOT (P.)
Pédiatrie-Puériculture	Mozziconacci (P.)	Psychiatrie infantile.....	DUCHE (D.)
	POLONOVSKI (C.)	Rhumatologie.....	DELVARRE (F.)
	ROSSIER (A.)		CERNEA (P.)
Pharmacologie.....	BOISSIER (J.)	Stomatologie	Chaput (Mme A.) m c agr
	LECHAT (P.)		GRELLET (M.)
Physiologie.....	DEJOURS (P.)	Thérapeutique.....	CHASSAGNE (P.)
	Gougerot (L.) M conf.		LAMOTTE (M.)
Physique médicale	pr. s. ch.		
	KELLERSHOHN	Urologie.....	QUENU (L.)

III --PROFESSEURS SANS CHAIRES ET AGREGES
CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE
à titre permanent.

Anatomie.....	DEBEYRE		GRASSET (J.)
	ABOULKER (P.)	Clinique obstétricale:	MAYER (M.)
	Ameline (A) pr. s. ch.		RAVINA (J.)
	HUGUIER (J.)	Clinique ophtalmo-	DESVIGNES (P.)
	OLIVIER (C.)	logique	OFFRET (G.)
Clinique chirurgicale	PADOVANI (P.)	Clinique oto-rhino-	
	POILLEUX (F.)	laryngologique.....	MADURO (R.)
	ROUX (M.)	Clinique pédiatrique et	
	VERNE (J. M.)	puériculture.....	LAPLANE (R.)
	DOMART (A.)	Clinique psychiatrique...;	BARUK (H.)
Clinique médicale	PERRAULT (M.)	Clinique urologique.....	KUSS (R.)
	RAMBERT (P.)	Médecine légale.....	GAULTIER
	THIEFFRY (S.)		

IV --PROFESSEURS DETACHES
DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie..... HAUDUROY (P.) Pr. S. Ch.

Pathologie chirurgicale..... RUDLER (J.) Pr. s. Ch.

BOLTANSKI (E.)

V. - CHARGES DE COURS D'HYGIENE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE

LAUNAY (C.)

Secrétaire général de la Faculté..... M. LENA

Secrétaires..... Mme BEURLAND (H.) ; Melle CHAINTREUIL (G.)

Mme ROCHE (L.)

Conservateur en Chef..... M. le Docteur HAHN (A.)

Conservateur Melle DUMAITRE (P.)

Bibliothécaires..... Mmes CONTET (J.) ; FORGET (F.)

Melle LAURANT (H.) ; LE NOIR (G.) ; QUIEVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A Monsieur le Professeur M.F. JAYLE

qui a bien voulu m'accueillir dans son
laboratoire. Il m'a donné le sujet de ce
travail et a dirigé mes recherches par
ses conseils précieux. Qu'il veuille
bien trouver ici l'expression de ma
respectueuse gratitude.

A Monsieur le Docteur JURET

qui m'a guidée dans le choix
des cas pathologiques à étudier
Je lui exprime ma reconnaissance
pour son aide.

AU R.P. MORETTI, Maître de recherches du C.N.R.S.

dont l'appui quotidien m'a permis
de surmonter bien des difficultés.
Qu'il trouve ici l'assurance de
mon respectueux attachement.

P L A N

INTRODUCTION : rappel sur l'haptoglobine

PREMIERE PARTIE = TECHNIQUES

A. - Préparations

- 1° - Préparation de l'hémoglobine
- 2° - Préparation de l'haptoglobine
- 3° - Préparation du complexe hémoglobine-haptoglobine.

B. - Dosages

- 1° - Dosage de l'hémoglobine
- 2° - Dosage de l'haptoglobine
- 3° - Dosage du complexe hémoglobine-haptoglobine
- 4° - Dosage de la glucosamine
- 5° - Dosage des hexoses
- 6° - Dosage de l'acide sialique

DEUXIEME PARTIE = RESULTATS

A. - Résultats des dosages de glucosamine

- 1° - Sur le complexe hémoglobine-haptoglobine
- 2° - Sur l'haptoglobine

B. - Résultats des dosages des hexoses

C. - Résultats des dosages d'acide sialique

RESUME ET CONCLUSIONS

I N T R O D U C T I O N

S'il est connu depuis longtemps que le cancer modifie la formule protéique du sérum, des travaux récents ont établi l'hyperprotéïnémie des cancers avancés (Loeper (1)), (Juret (2)) et l'élévation du taux des glycoprotéines dans les liquides d'ascite de cancéreux (Warren (3)).

Le cancer ne perturbe pas seulement le taux des protéines sériques, Dans certains cas, on a constaté également une modification de la composition chimique de certains mucopolysaccharides ; d'après Kawasaki (4), le mucopolysaccharide cancéreux diffère des composants normaux de la muqueuse gastrique par une teneur plus forte en acide sialique. Turumi et ses collaborateurs (5,6,7) ont isolé, à partir de liquides d'ascite cancéreux, une substance analogue à l'orosomucoïde mais non identique. De même Putmann (8) pense que les cellules cancéreuses produiraient un type unique de globulines anormales, se différenciant de la protéine normale par des altérations de structure. Des globulines anormales ont été mises en évidence dans les myélomes et dans la maladie de Waldenström.

Dans les maladies néoplasiques, le taux de α_2 -globulines augmente. Or l'haptoglobine est la principale variable des α_2 -globulines. Le cancer modifie donc la production de l'haptoglobine par l'organisme. Cette perturbation est-elle purement d'ordre quantitatif ? .. ou bien entraîne-t-elle également une modification de la structure chimique de l'haptoglobine ?.. On est en droit de se le demander. C'est pourquoi nous nous sommes proposés d'étudier les modifications éventuelles de la composition chimique de l'haptoglobine chez les cancéreux.

Ce choix de l'haptoglobine pour notre étude repose, entre autres motifs, sur le fait que cette glycoprotéine peut s'obtenir à l'état purifié plus facilement que les autres glycoprotéines susceptibles de varier dans les affections cancéreuses, comme par exemple l'orosomucoïde. De plus, avant de commencer ce travail nous avons déjà utilisé de nombreuses fois les méthodes de préparation et de dosage de l'haptoglobine.

Il n'était pas question d'établir les modifications de la partie protéique de l'haptoglobine, l'étude de sa composition et de sa structure nécessitant la mise en oeuvre de techniques longues et délicates. Nous avons donc limité nos recherches aux variations possibles de la composition glucidique de l'haptoglobine de cancéreux. Nous exposerons successivement les techniques de dosage employées et les résultats obtenus.

Avant d'aborder la partie expérimentale de ce travail, nous rappellerons brièvement les données relatives à l'haptoglobine (que nous écrirons dorénavant Hp.), données indispensables à la compréhension de ce travail.

L'HAPTOGLOBINE

En 1938, Jayle et Polonovski (9,10,11) étudièrent les propriétés peroxydasiques de l'hémoglobine. Ils observèrent que son activité était augmentée par addition d'un sérum humain normal et davantage encore par certains sérums pathologiques. Ils pensèrent qu'il existait une protéine sérique se fixant sur l'hémoglobine et formant avec celle-ci un complexe doué d'activité peroxydasique supérieure à celle de l'hémoglobine (Hb) seule. Cette hypothèse fut confirmée. Ils nommèrent haptoglobine cette protéine. (du grec haptô : je me fixe sur)

Depuis lors, l'haptoglobine a été obtenue à partir d'urine de néphrose lipoïdique (12,13), de plasma et de liquide d'ascite.

L'haptoglobine a été préparée à l'état pur dans notre laboratoire. Ses propriétés physiques et ses propriétés chimiques ont été déterminées. (14)

Propriétés Physiques

En 1955, Smithies (15), grâce à l'électrophorèse des protéines sériques à travers gel d'amidon, classa les sérums en plusieurs types.

Le 1er type est caractérisé par la présence de l'haptoglobine au niveau de la bande Fast α_2 seule, le complexe Hp-Hb migrant au niveau des α_2 -globulines (Fig 1)

Le 2ème type est caractérisé par la présence de trois bandes entre les $\text{Slow}\alpha_2$ et les β -globulines, bandes susceptibles de former avec l'Hb trois complexes de mobilité plus faible. Ces bandes constituent l'haptoglobine du type II B ou 2-2.

Le 3ème type présente à la fois de l'haptoglobine du type II et de l'Hp du type I. Cette Hp est dite du type II A ou 2-1.

D'après Smithies (16) il existerait deux gènes commandant l'apparition dans le sang de la forme Hp I ou Hp II de l'haptoglobine. Les individus du groupe I seraient des homozygotes hp_1-hp_1 , ceux du groupe II B des homozygotes hp_2-hp_2 , ceux du groupe II A des hétérozygotes hp_1-hp_2 . La figure 1 schématise les 3 phénotypes d'haptoglobine qui correspondent à ces trois génotypes, ainsi que leurs complexes.

L'Hp I a un poids moléculaire d'environ 100.000. Toutes les haptoglobines sont des α_2 globulines de $pH_i = 4,1$. Les Hp II doivent être des polymères de l'Hp I.

Propriétés chimiques

L'haptoglobine est une glycoprotéine. Elle comprend 80 % de protéines et 20 % de sucres. Ces sucres sont formés de 8,5% d'hexoses dont 1% environ de fucose. Il semble que le galactose et le mannose soient présents en quantités très voisines. Peut être y a-t-il une légère prédominance du galactose

Le taux d'acide N-acetyl-neuraminique est situé entre 5,6 et 6,5%. Celui de la glucosamine est de 5,4 % à 5,6%. (Tableau 1).

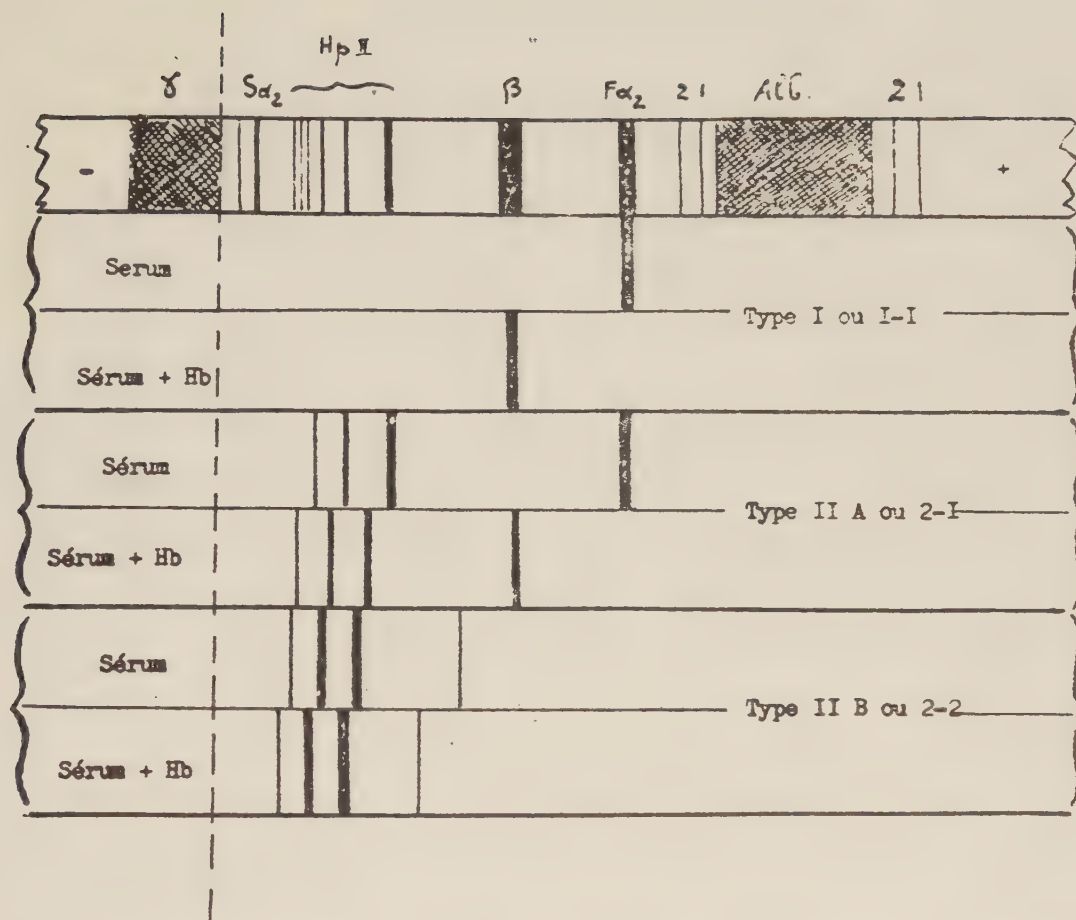


Figure I. - Electrophorèse en gel d'amidon d'un sérum normal et des différents types d'Haptoglobine et de leurs complexes avec l'Hémoglobine.

(Représentation schématique)

De haut en bas :

Sérum du groupe II.

Haptoglobine du type I et son complexe

Haptoglobine du type 2-I et ses complexes

Haptoglobine du type 2-2 et ses complexes

TABLEAU I

Propriétés physico-chimiques des Haptoglobines

	Hp I	Hp II
Poids moléculaire	100.000	100 000 x n
Point isoélectrique	4,1	4,1
Constante de sédimentation	4,3	6,5
Coefficient d'extinction : $E \frac{1 \text{ cm}}{1 \%}$ à 278 m μ		
Hexoses		8.4 %
Fucose		1.0 %
Glucose		0.5 %
Glucosamine		5.5 %
Acide sialique		6.0 %
Protéine (biuret)		78.6 %

PREMIERE PARTIE

T E C H N I Q U E S .

Dans la première partie de ce travail, nous décrirons les techniques qui nous ont permis d'obtenir les résultats que nous indiquerons dans la deuxième partie.

Ces techniques sont classées sous deux rubriques :

A- Préparations

B- Dosages

Pour chaque malade examiné, nous ne disposions que de 20 à 30 ml de plasma. Dans ces conditions, il n'était pas possible de retirer d'un si faible volume l'Hp, mais son complexe hémoglobinique Hp-Hb. Ce choix présente un double avantage car si l'obtention du complexe pur est plus aisée que celle de l'Hp, le rendement de la préparation du complexe est bien supérieur à celui de l'Hp.

A. - PREPARATIONS

1° - PREPARATION de l'HEMOGLOBINE HUMAINE

On recueille le sang par ponction veineuse sur mélange de Wintrobe. On le centrifuge à 5.000 tours/minute pour séparer globules et plasma. On lave les globules avec du sérum physiologique (contenant 9g % de ClNa). Pour un volume de globules on utilise 3 ou 4 volumes de sérum physiologique. On sépare les globules par centrifugation ; 4 ou 5 lavages suffisent pour éliminer toute trace de plasma. Toutes ces opérations sont faites avec une centrifugeuse refroidie entre 0° et 4°. Les globules lavés sont alors laqués. Pour cela on emploie un mélange eau-toluène. A un volume de globules, on ajoute 2 volumes d'eau et un volume de toluène. On agite pendant une heure. Les globules éclatent libérant l'hémoglobine des stromas. Une centrifugation permet de séparer le toluène et les stromas de l'Hb. La centrifugation doit être très poussée : 1 heure à 10 à 15.000 t/m. Une nouvelle centrifugation à la même vitesse n'élimine pas d'autres stromas.

Nous avons choisi le toluène et l'eau pour laquer l'Hb de préférence à l'éther et l'eau car le toluène est un agent moins dénaturant que l'éther.

Mais l'Hb ainsi obtenue est un mélange d'hémoglobine et d'oxyhémoglobine. Aussi, pour travailler sur un produit bien défini et stable, nous avons utilisé non pas l'Hb mais la cyanmethémoglobine.

Sa préparation se fait en deux temps :

a) - Transformation de l'hémoglobine en methémoglobine

On l'obtient par l'action du ferricyanure de potassium qui oxyde le fer ferreux en fer ferrique. A 100 mg d'Hb on ajoute 15 à 20 mg de ferricyanure. On laisse en contact quelques heures. La solution d'Hb brunit presque instantanément.

b) - Transformation de la méthémoglobine en cyanméthémoglobine A 100 mg de méthémoglobine, on ajoute 2,5 mg de cyanure de potassium. La coloration vire au rouge porto. Par dialyse contre du tampon phosphate à pH 7, on élimine l'excès de cyanure de potassium.

2° -PREPARATION de l'HAPTOGLOBINE HUMAINE.

Elle varie selon qu'il s'agit de l'Hp du type I de l'Hp du type II.

Un fractionnement du plasma au sulfate d'ammonium, suivi d'une électrophorèse de zone sur colonne d'amidon permet d'obtenir de l'Hp I pure (17).

Pour préparer l'Hp II nous avons combiné les méthodes indiquées par Herman-Boussier, Moretti, Jayle (17) et par Laurel (18). Ainsi la préparation de l'Hp II comprend quatre étapes.

- a) - fractionnement du plasma au sulfate d'Ammonium (SO_4Am_2)
- b) - action d'un solvant organique : l'acétone
- c) - nouveau fractionnement au sulfate d'Ammonium
- d) - électrophorèse de zone sur colonne d'amidon.

I. - Préparation de l'Hp 1

- a) - fractionnement au sulfate d'ammonium.

L'Hp 1 précipite entre 52 et 61 % de saturation en SO_4Am_2 . Dans un premier temps, on précipite le plasma à 50 % de saturation en SO_4Am_2 . Pour cela il est dilué cinq fois avec du sérum physiologique (contenant 9g p.1000 de ClNa). Une telle dilution est nécessaire pour une bonne précipitation des protéines. On ajoute lentement un volume de SO_4Am_2 saturé, à pH 7,5 égal au volume du plasma dilué. On agite. Un précipité se forme. On l'élimine par centrifugation. Il contient des γ -globulines, des macroglobulines et de l'albumine.

On amène le filtrat à 65% de saturation en SO_4Am_2 par addition de SO_4Am_2 cristallisé afin de ne pas augmenter le volume total. On élimine le filtrat formé d'albumine et de préalbumine (orosomucoïde et préalbumine de Schultze.) Le précipité contient l'Hp I, des β -globulines, de l'albumine et des post-albumines.

On dialyse ce précipité dissous dans l'eau contre une solution de bicarbonate de potassium 0,002M. Lorsque le dialysat ne donne plus aucune coloration avec le réactif de Nessler, on précipite le produit dialysé à 54% de saturation en SO_4Am_2 .

On élimine le précipité. On amène le filtrat à 61 % de saturation en SO_4Am_2 . Le précipité formé contient la plus grande partie de l'Hp ainsi que des traces d'albumine et de β -globulines. Après dialyse contre de l'eau distillée, on concentre la solution de protéines jusqu'à un volume de 2,5 cm³.

A ce stade l'Hp I obtenue est à 70 % de pureté.

Pour obtenir une haptoglobine pure, il est nécessaire de recourir à une électrophorèse de zone sur colonne d'amidon.

b) - Electrophorèse de zone.

Nous avons employé l'appareil décrit par Bourrillon et Got (19). Il est formé de deux colonnes de verre de 60 cm de haut, 3 cm de diamètre réunies à la base par un raccord en caoutchouc. A leur partie supérieure, un tube de verre de 1 cm de diamètre permet de les relier chacune à un bac à électrode. La colonne anodique présente à la partie inférieure un étranglement qui retient un peu de laine de verre et se termine par un robinet (fig. 2).

Comme support solide, on utilise l'amidon de pomme de terre, lavé à l'eau distillée, puis à l'alcool éthylique absolu. La partie inférieure de l'appareil est remplie de tampon véronal sodique (acétate de sodium acide chlorydrique 0,05 M), à pH 8,6. On verse jusqu'à mi-hauteur de la colonne à robinet de l'amidon en suspension dans ce tampon. Après sédimentation, on laisse écouler le tampon qui dépasse le niveau de l'amidon. On dépose les 2,5 ml de solution de protéines et on laisse descendre le liquide dans l'amidon à 2 cm. On complète le remplissage de la colonne avec de l'amidon en suspension dans le tampon. On applique aux électrodes une tension continue de 400 volts. L'électrophorèse se fait à + 4°. L'Hp ayant un pH_1 de 4,1 migre vers l'anode. Au bout de 24h, on arrête l'électrophorèse. On laisse le tampon s'écouler par le robinet inférieur. La colonne d'amidon s'égoutte ainsi pendant 4 h. On relie la base à une source d'air comprimé.

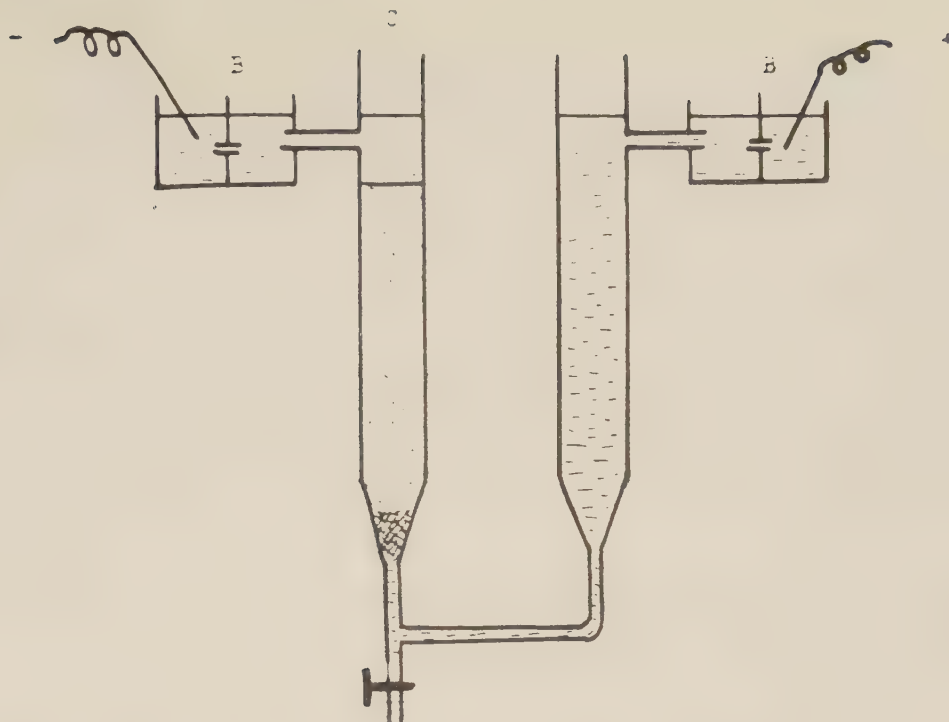


Figure 2. - Electrophorèse de zone sur colonne d'amidon.

Schéma du montage. B : bac à électrodes. C : colonne.

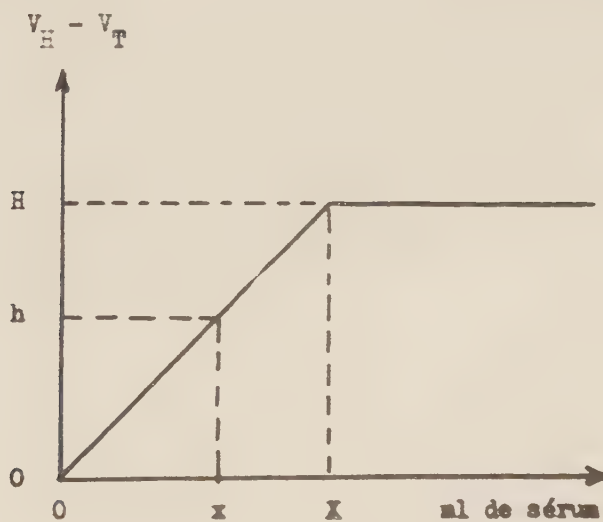


Figure 3. - Dosage de l'haptoglobine.

Activité peroxydasique du complexe Hb - Hp mesurée par la quantité d'iode libérée et dosée par l'hyposulfite.

On extrait le cylindre d'amidon que l'on découpe en tranches successives de 1 à 2 cm d'épaisseur. On élue chaque tranche avec 2 fois 4 ml d'eau distillée. On obtient ainsi une vingtaine de fractions. Dans deux ou trois de ces fractions, l'Hp I est pure.

II. - Préparation de l'Hp II.

a) - fractionnement au sulfate d'ammonium.

L'haptoglobine du type II précipitant entre 42 et 51 % de saturation en $\text{SO}_4 \text{Am}_2$, on opère une première précipitation entre 40 et 55% de saturation en $\text{SO}_4 \text{Am}_2$.

Le plasma dilué par du sérum physiologique est additionné de $\text{SO}_4 \text{Am}_2$ saturé à pH 7 de façon que la concentration finale de la solution soit de 40% en $\text{SO}_4 \text{Am}_2$ et que le volume final soit de 9 fois le volume initial. On laisse les protéines flocculer pendant 15 heures. Par centrifugation, on sépare du filtrat le précipité contenant les γ et les β -globulines.

Ce filtrat est amené à 55 % de saturation en $\text{SO}_4 \text{Am}_2$. Après un repos de 15 heures, une centrifugation sépare le filtrat, contenant surtout de l'albumine, du précipité formé d' α_1 , d' α_2 et β -globulines.

Le précipité repris par l'eau contient 20 à 30 % d'Hp II. Pour augmenter la pureté de cette solution, nous avons alors recours aux solvants organiques et en particulier à l'acétone.

b) - Action des solvants organiques.

On ajoute au précipité précédent une quantité d'eau telle que la concentration finale en protéines soit de 2 à 3% . On amène le pH de l'ensemble à 5,2 avec de l'acide acétique. A la solution refroidie à 0°, on ajoute lentement, en agitant, de l'acétone réfrigérée à -15°. La concentration finale doit être de 50 % en acétone. On laisse la solution 1/2 heure à -4°. On centrifuge.

On sépare ainsi 3 fractions : dans le fond du tube à centrifuger, une solution saline saturée de $\text{SO}_4 \text{Am}_2$; au-dessus, un "cake" protéique ; enfin, un surnageant acétonique.

On recueille le "cake " protéique. On y ajoute de l'eau distillée à 0°. L'ensemble reste trouble. Une fraction des protéines est soluble dans l'eau ; l'autre ne l'est pas. Dans la solution aqueuse se trouve la majeure partie de l'haptoglobine. On centrifuge à 4°. On recueille le surnageant. On dialyse contre du tampon acéto-acétique 0,005 M à pH 5 pendant 12 heures. On élimine le précipité de céruloplasmine formé au cours de la dialyse. Le surnageant contient de l'haptoglobine à 50 % de pureté. On opère alors sur le surnageant une nouvelle précipitation saline.

c) - Précipitation saline

On amène le surnageant à une teneur de 42 % de saturation en SO_4Am_2 . On élimine le précipité qui est très léger. On amène le filtrat à 51 % de saturation en SO_4Am_2 . L'Hp et d'autres α_2 globulines précipitent. On élimine le surnageant qui comprend des traces d'albumine et d' α_1 globulines. Le précipité dissous dans l'eau contient l'Hp II à 60% de pureté. On dialyse contre du sesquicarbonate 0,02 M.

Après concentration dans un évaporateur sous vide, pour amener le volume de la solution d'Hp II à 2 ml, on isole l'Hp des autres α_2 globulines par une électrophorèse de zone sur colonne d'amidon.

d) - Electrophorèse de zone

L'appareil et le mode opératoire sont identiques à ceux utilisés pour l'Hp I. Seuls différent le tampon employé et le temps de migration.

On opère avec du tampon acéto-acétique de concentration 0,05 M et de pH 5,6. Mais la solution acéto-acétique étant un mélange faiblement tamponné, on emploie un dispositif régulateur du pH. Dans ces conditions, l'Hp migre vers l'anode. Après 40 heures d'électrophorèse, on découpe la colonne d'amidon comme il a été dit pour l'Hp I.

On obtient ainsi de l'Hp II pure.

3° - PREPARATION du COMPLEXE HAPTOGLOBINE-HEMOGLOBINE

Nous avons travaillé sur des plasmas dans le cas de cancers du sein, sur des liquides d'ascite dans le cas de cancers ayant donné des métastases péritonéales. Quel que soit le substrat d'origine (plasma ou ascite), le mode opératoire est sensiblement le même (20). Il s'effectue en trois étapes :

- a) - purification sommaire de l'haptoglobine par double précipitation au SO_4Am_2 (40-50 %)
- b - formation du complexe
- c - purification de ce complexe par double précipitation au SO_4Am_2 .

a) - On effectue une purification sommaire en éliminant les globulines d'une part, les albumines d'autre part. A titre d'exemple; nous traiterons le cas d'un plasma du groupe II. A 50 ml de plasma, on ajoute 220 ml de sérum physiologique puis 180 ml de SO_4Am_2 saturé à pH 7. Après un repos de 15 heures, on centrifuge, on élimine le précipité formé par les γ globulines.

On amène le filtrat à une concentration de 50% de saturation en SO_4Am_2 . Pour cela, on ajoute 141 g de SO_4Am_2 cristallisé. On laisse les protéines flocculer pendant 15 heures. On centrifuge. On élimine le filtrat formé d'albumine. On reprend le précipité dans le minimum d'eau, on le dialyse contre du sesquicarbonate d'ammonium 0,02 M.

On effectue un dosage d'haptoglobine afin de calculer la quantité total d'haptoglobine contenue dans la solution ; soit 91 mg d'Hp.

- b) - Formation du complexe

On sait qu'à 100 mg d'haptoglobine se combinent 68 mg d'hémoglobine. On ajoute donc à la solution la quantité d'hémoglobine devant saturer la totalité de l'haptoglobine dosée : pour cela on ajoute donc 91 ml d'hémoglobine $5 \cdot 10^{-5}$ M (En fait, dans ce travail nous avons utilisé non pas l'hémoglobine mais la cyanmethémoglobine pour des raisons de stabilité).

La combinaison entre les deux protéines est instantanée.

c) Purification du complexe.

Cette dernière purification repose sur le fait que le complexe Hp--Hb précipite entre 57 % et 66 % de saturation en SO_4Am_2 , alors que l'hémoglobine précipite entre 71 % et 81 %.

On amène le complexe à un volume de 45 ml avec de l'eau distillée (cette dilution est nécessaire pour séparer les protéines par fractionnement salin). On ajoute 45 ml de SO_4Am_2 à pH 7. La solution est à 50% de saturation en SO_4Am_2 . On élimine le précipité ; le complexe se trouve dans le surnageant. On précipite par du SO_4Am_2 de façon que la concentration finale soit de 70% de saturation. On ajoute pour cela une quantité de SO_4Am_2 de 12,1 g.

S'il se trouve de l'hémoglobine en excès, elle reste dans le surnageant. Le précipité repris dans de l'eau est dialysé contre un tampon phosphate 0,005 M, pH 7.

Critères de pureté du complexe.

Pour déterminer la pureté du complexe, nous avons utilisé trois critères qualitatifs :

- électrophorèse sur papier
- électrophorèse à travers gel d'amidon
- immuno-électrophorèse.

1°) - Electrophorèse sur papier.

Que les complexes proviennent d'une Hp du type I ou du type II, leurs migrations électrophorétiques sont identiques sur le papier. A pH 8,6, en tampon véronal 0,1 M, les électrophorèses ne présentent qu'une seule bande mise en évidence par une coloration à la benzidine ou à l'amidoschwartz. La migration du complexe se situe au niveau des α_2 -globulines.

2°) - Electrophorèse à travers gel d'amidon

Elle ne montre pas de protéines étrangères à pH 8,6.

Dans le cas d'un complexe formé à partir d'un plasma du groupe I, la migration électrophorétique se fait au niveau des β -globulines. Si le complexe est formé à partir d'un plasma du groupe II, la migration électrophorétique des bandes du complexe est un peu moins rapide que celle des Hp correspondantes

3°) - Immuno-électrophorèse .

Nous avons éprouvé la pureté de nos produits en soumettant les complexes à l'immuno-électrophorèse en gélose, avec du sérum antisérum humain total et antihémoglobine. On ne révèle, par cette méthode, ni protéine étrangère, ni excès d'hémoglobine. Les plaques montrent un seul arc correspondant au complexe Hb-Hp.

B. - D O S A G E S

1° - DOSAGE de l'HEMOGLOBINE

Ce dosage peut se faire sur l'hémoglobine proprement dite ou sur ses dérivés : cyanhémoglobine, méthémoglobine. Comme nous n'avons travaillé que sur la cyanmethémoglobine, nous ne décrirons ici que la méthode de dosage de ce dérivé de l'hémoglobine.

Nous avons employé une méthode spectrophotométrique en nous référant aux valeurs des coefficients d'extinction donnés par Donaldson (21). Nous avons établi la courbe d'absorption de notre cyanmethémoglobine par rapport à la courbe d'absorption théorique. Elle en diffère un peu. Ceci est peut-être dû à une transformation incomplète de l'hémoglobine en cyanmethémoglobine (nous devons avoir un mélange de cyanmethémoglobine et de méthémoglobine). Pour remédier à cet inconvénient, nous avons dosé la cyanmethémoglobine en nous plaçant à 2500 Å, longueur d'onde, qui correspond au point isobestique. A cette longueur d'onde, cyanmethémoglobine et méthémoglobine ont même coefficient d'extinction; une solution contenant 1% de cyanmethémoglobine a une densité optique de 5,26.

Dans le cas de la cyanmethémoglobine préparée, nous avons trouvé pour une dilution du 1/76 une densité optique de 0,36. 100 ml de notre solution contiennent donc $\frac{0,36 \times 76}{5} = 5,2$ g de cyanmethémoglobine ; si on admet 68.000 comme poids moléculaire de l'hémoglobine, la molarité de notre solution est de

$$\frac{M \times 68.000}{52 \times 4} = \frac{M}{317} \quad \text{en fer}$$

Ce dosage permet d'évaluer la pureté de la cyanmethémoglobine utilisée. On calcule d'une part la quantité de protéines contenue dans 100 ml de la solution d'hémoglobine. Pour cela, on mesure la densité optique de la solution d'hémoglobine à 2870 Å. A cette longueur d'onde, la cyanmethémoglobine a un coefficient d'absorption de 2,09. On calcule d'autre part la quantité de cyanmethémoglobine contenue dans la solution en mesurant la densité optique à 5200 Å. Seul l'hème absorbe et son coefficient d'absorption est 0,526.

Si la solution de cyanmethémoglobine est pure, les quantités de protéine calculées d'après les densités optiques lues à 2800 Å et à 5200 Å doivent être identiques.

Dans le cas de cyanmethémoglobine que nous avons préparée, nous avons trouvé les résultats suivants :

Dilution	: d ₀ à 2780 Å	: d ₀ à 5200 Å
-----	-----	-----
1/76 x3	0,482	
1/76		0,36

A la longueur d'onde 2780 Å, nous avons donc :

$$\frac{0,482 \times 76 \times 3}{2,09} = 52,5 \text{ mg/ml}$$

A la longueur d'onde 5200 Å :

$$\frac{0,36 \times 76}{0,536} = 52 \text{ mg/ml}$$

Notre cyanmethémoglobine ne contient donc pas de protéines étrangères à l'Hb.

2° - DOSAGE de l'HAPTOGLOBINE

a) Principe

En présence d'hydroperoxyde d'éthyle, sous l'action du complexe hémoglobine-haptoglobine, l'iodure de potassium est oxydé en iode dans des conditions de température et de pH bien déterminées. L'iode libéré par la réaction est dosé par l'hyposulfite de sodium à la fin de la cinquième minute (22).

b) Mode opératoire.

On prépare une solution d'Hb de cheval dont l'activité peroxydasique est supérieure à celle de l'Hb humaine. On l'amène au titre de $5 \cdot 10^{-5}$ M en fer hématique ou $1.25 \cdot 10^{-5}$ M en Hb.

Dans un creuset en porcelaine plongé dans un bain-marie à 32° , on mélange à 0,1 ml de la solution d'Hb un volume V de sérum inférieur à 0,1 ml, puis 3 ml d'une solution d'iodure de potassium 0,1 M.

Dans un deuxième creuset, on verse 1 ml d'hydroperoxyde d'éthyle 0,1 M, 10 ml de tampon acéto-acétique & pH 4,4 et 0,5 ml d'une solution d'iode centinormale qui inhibe en partie l'activité enzymatique de l'Hb libre.

On verse le contenu du deuxième dans le premier et l'on déclanche le chronomètre. Au bout de 4 minutes 30 secondes, on ajoute 2 gouttes d'empois d'amidon ; le liquide beuit. On verse alors de l'hyposulfite de sodium 0,01 M jusqu'à décoloration complète qui doit être obtenue à la fin de la cinquième minute. Soit V_H le volume d'hyposulfite versé ; il correspond à la quantité d'iode libérée par la réaction pendant ces cinq premières minutes.

On recommence une opération identique avec l'Hb seule, en absence de sérum ; elle exige un volume d'hyposulfite V_T ; c'est la valeur témoin. V_T correspond à :

- l'excès d'iode mis au début pour inhiber l'activité de l'Hb,
- l'iode libéré par l'Hb,
- l'iode libéré par l'action du peroxyde seul sur l'iodure de potassium.

Portons en ordonnées les valeurs $V_H - V_T$ correspondant à différents volumes V_S de sérums portés en abscisses (fig 3). Pour des valeurs de V_S inférieurs à X la quantité d'iode libéré est proportionnelle à V_S ; pour des valeurs de V_S supérieures à X , elle reste constante et égale à $V_H - V_T = H$.

Soit X le volume de sérum qui sature exactement 0,1 ml de solution d'Hb $1,25 \cdot 10^{-5}$ M. Par définition, l'indice d'Hp de ce sérum est égal à $0,1/X$. Soit h et H les volumes d'hyposulfite, correspondant aux quantités d'iode libérées par les volumes x et X de sérum. On a :

$$\frac{x}{X} = \frac{h}{H} \quad \text{ou} \quad X = \frac{H}{h}$$

Puisque H est constant, il suffit donc d'un seul dosage avec une prise d'essai x de sérum pour connaître X .

3 - DETERMINATION de la QUANTITE et de la PURETE du COMPLEXE

On peut déterminer quantitativement la teneur d'une solution en complexe soit en dosant l'hématine, soit en dosant les protéines.

a) Dosage de l'hématine

La méthode a été décrite précédemment lors du dosage de la cyanmethémoglobine. Nous donnerons seulement une application.

Prenons la densité optique d'une solution de complexe à 520 mμ ; elle est de 1,43. Ceci correspond à une quantité de cyanmethémoglobine de $\frac{1,43}{0,526} = 2,73$ mg/ml. Comme une molécule de cyanmethémoglobine s'unit à une molécule d'haptoglobine, 68.000 g de cyanmethémoglobine s'unissent à 100.000 g d'Hp, ou encore, à 68.000 g de cyanmethémoglobine correspondent 168.000 g de complexe.

A 2,72 mg de cyanmethémoglobine correspond donc :

$$\frac{168.000 \times 2,72}{68.000} = 6,72 \text{ mg}$$

b - Dosage de la partie protéique

A 280 mμ, la densité optique de la même solution est de 10,05. Calculons le coefficient d'extinction théorique du complexe.

A 280 mμ, la densité optique correspondant à 0,680 mg de cyanmethémoglobine est de $2,09 \times 0,680 = 1,42$.

A 280 mμ la densité optique correspondant à 1 mg d'Hp est de $1 \times 1,21 = 1,21$.

La densité optique correspondant à 1,680 mg de complexe est de $1,42 + 1,21 = 2,63$.

Le coefficient d'extinction du complexe est donc de

$$\frac{2,63}{1,68} = 1,56.$$

La quantité de complexe calculée d'après la lecture faite à 280 mμ est donc de $\frac{10,05}{1,56} = 6,4$ mg.

De la concordance des résultats obtenus par dosage de l'hématine et par dosage de la partie protéique, on déduit la pureté du complexe qui dans cet exemple est de $\frac{6,4}{6,4} \times 100 = 95\%$.

La pureté des complexes que nous avons obtenus varie entre 90 et 97 %.

4°) DOSAGE de la GLUCOSAMINE

Le dosage de la glucosaminé a été pratiqué suivant la technique d'Elson et Morgan (23) modifiée par Bux (24). L'hexosamine acétylée par l'acétyl-acétyl-amine donne une réaction colorée avec le paradiméthylaminobenzaldéhyde. Mais, pour que la réaction ait lieu, l'hexosamine doit être libre ; ceci nécessite une hydrolyse préalable de la protéine.

a- Hydrolyse de la protéine et neutralisation

On ajoute 2,5 ml d'HCl Merk 2N, dans des tubes rodés, à 0,5 ml d'une solution contenant environ 2 mg de complexe.

Les tubes bouchés sont mis à l'étuve à 100° pendant 10 heures.

Après refroidissement à la température ambiante, on ajoute 0,5 ml de soude 10 N de façon à neutraliser l'acide chlorhydrique ayant servi à l'hydrolyse. On ajuste à la goutte près, avec de la soude 2N, puis avec de la soude N, la solution, afin que celle-ci ait un pH de 7 à 8. Pour cela, on plonge un agitateur effilé dans la solution et on vérifie le pH au papier indicateur.

On complète alors à 4 ml le volume de chaque tube avec de l'eau bidistillée ; sur ces 4 ml on prélève à la pipette 3 ml qui sont versés dans un tube à essai à bouchon rodé.

Le dosage va donc s'effectuer sur les 3/4 de la glucosamine initiale.

b - Préparation d'une gamme étalon.

On pèse 1/10ème mg 100mg de glucosamine, mise dans un dessiccateur sous vide 24 h. auparavant. Ces 100mg sont dissous dans 100ml d'eau bidistillée. On prélève 5 ml de cette solution. On complète à 50 ml avec de l'eau bidistillée. On obtient donc une solution contenant 100 γ de glucosamine par ml.

Dans des tubes à essai rodés, numérotés de 1 à 6, on dépose respectivement 0, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 ml de la solution étalon. On complète à 3 ml avec de l'eau bidistillée.

c- Acétylation de la glucosamine

Dans les tubes contenant les quantités connues et inconnues de glucosamine, on ajoute à la burette 5,5 ml d'acétylacétone. On agite. (La solution d'acétylacétone est préparée de la façon suivante : 150 ml de CO_3Na_2 normal, on ajoute 22,5 ml d'HCl normal et 1,47 ml d'acétylacétone maintenu au froid et fraîchement distillé.) On plonge les tubes 20 minutes au bain-marie bouillant.

d- Réaction colorée.

On refroidit les tubes 1 à 2 minutes sous un courant d'eau froide. On ajoute alors à la burette 5 ml d'alcool absolu dans chaque tube, ainsi que 2,5 ml du réactif d'Erlich. On agite les tubes. On les abandonne 24 h. à la température ambiante.

(on prépare le réactif d'Erlich de la façon suivante : à 0,8 g de paradiméthylaminobenzaldéhyde Merk. on ajoute 30 ml d'HCl 12 N Merck et 30 ml d'alcool éthylique).

e) - Lecture

Une coloration rose se développe. L'absorption est maximum pour une longueur d'onde de 5150 Å.

On mesure la densité optique des échantillons par rapport au tube témoin ne contenant pas de glucosamine. Un échantillon contenant uniquement de l'Hb montre que celle-ci absorbe très peu à la longueur d'onde donnée. 1.000 γ d'Hb correspondant à une quantité de complexe de 2408 donnent une absorption de 0,02 au photomètre. Le photomètre employé n'étant pas sensible à des variations de densité optique de cet ordre, nous pouvons négliger les valeurs des densités optiques dues à l'hémoglobine.

f)- Résultats

On porte en abscisses les quantités de glucosamine et en ordonnées les densités optiques correspondant à ces quantités.

On obtient une droite passant par l'origine

5- DOSAGE des HEXOSES

Nous avons employé la méthode de Lustig et Langer (25) modifiée par Weimer et Moshin (26). Après hydrolyse de la protéine par une solution d'acide sulfurique, les hexoses libérés donnent une coloration jaune orangé, avec l'orcinol. On compare au photomètre l'intensité de cette coloration à celles obtenues à partir de quantités connues d'hexoses.

a) - Préparation d'une gamme étalon.

On pèse au 1/10ème de mg 75 mg d'un mélange en quantités égales de mannose et galactose. L'haptoglobine contenant des quantités sensiblement équivalentes de galactose et de mannose, pour doser les hexoses totaux, il est logique d'utiliser un mélange équimoléculaire de ces deux sucres.

Ces 75 mg sont dissous dans de l'eau bidistillée de façon à obtenir une solution contenant 120% d'hexoses par ml. Cette solution constitue la solution étalon.

Dans des tubes à essai rodés, on dépose respectivement 0,0, 2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 ml de la solution étalon. On complète à 1 ml avec de l'eau bidistillée. Chaque dosage est effectué en double.

b) - réaction colorée

A 1 ml de la solution de glycoprotéine à doser contenant 60 à 80% de sucre, ainsi qu'aux différents tubes contenant la solution étalon, on ajoute 8.5 ml du réactif à l'orcinol. (Le réactif à l'orcinol est préparé ainsi : 160 mg d'orcinol Merck sont dissous dans 10 ml d'eau additionnée de 75 ml d'acide sulfurique à 60%).

Après agitation dans un bain d'eau glacée, les tubes bouchés sont placés 15 minutes au bain-marie maintenu à 100°. Une coloration jaune orangée apparaît.

Nous avons modifié la température de l'hydrolyse par rapport à celle indiquée par Weimer et Moshin. Nous avons en effet étudié la durée et la température optima d'hydrolyse pour une libération totale des sucres de la protéine sans destruction de ceux-ci.

1° - Nous avons hydrolysé pendant un temps constant de 15 minutes, mais à des températures variables, des échantillons d'Hp d'une part, et d'autre part des quantités diverses d'un mélange galactose-mannose.

En portant en abscisses les quantités de sucres contenues dans les prises d'essai de la gamme étalon et en ordonnées les densités optiques correspondantes, nous voyons que les sucres ne sont pas détruits par une hydrolyse de 15 minutes à 100°. En effet, à une quantité donnée du mélange galactose-mannose correspond, après une hydrolyse à 100°, une densité optique supérieure à celle obtenue après une hydrolyse à 80°. (fig 4).

De même, si nous portons en abscisses les températures d'hydrolyse et en ordonnées les quantités de sucre libéré à partir de divers échantillons d'haptoglobine, nous voyons que la quantité de sucre libéré augmente avec la température (fig. 5).

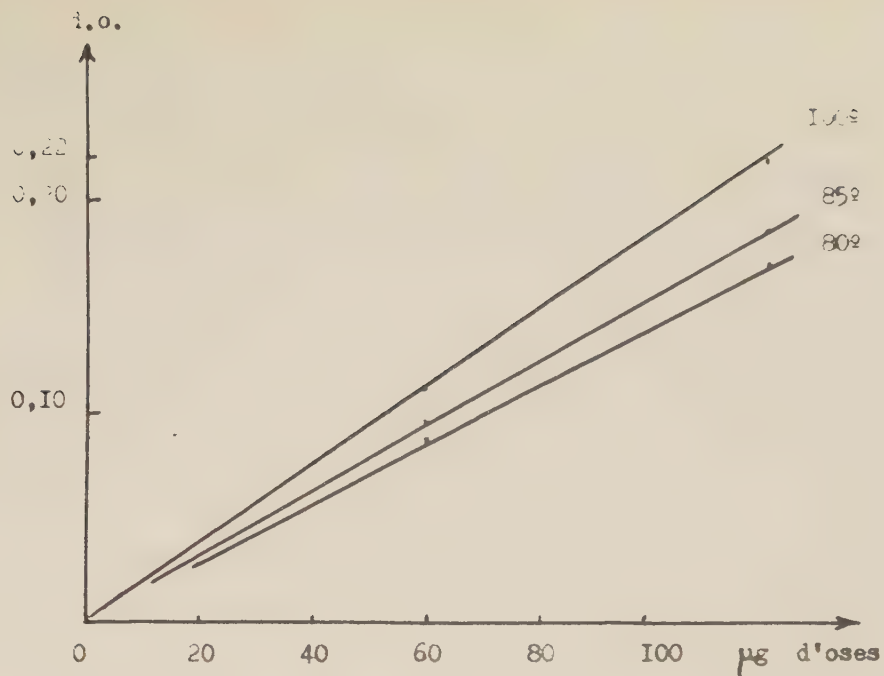


Figure 4. - Dosage d'un mélange de galactose et de mannose en parties égales, après chauffage pendant 15 minutes à diverses températures.

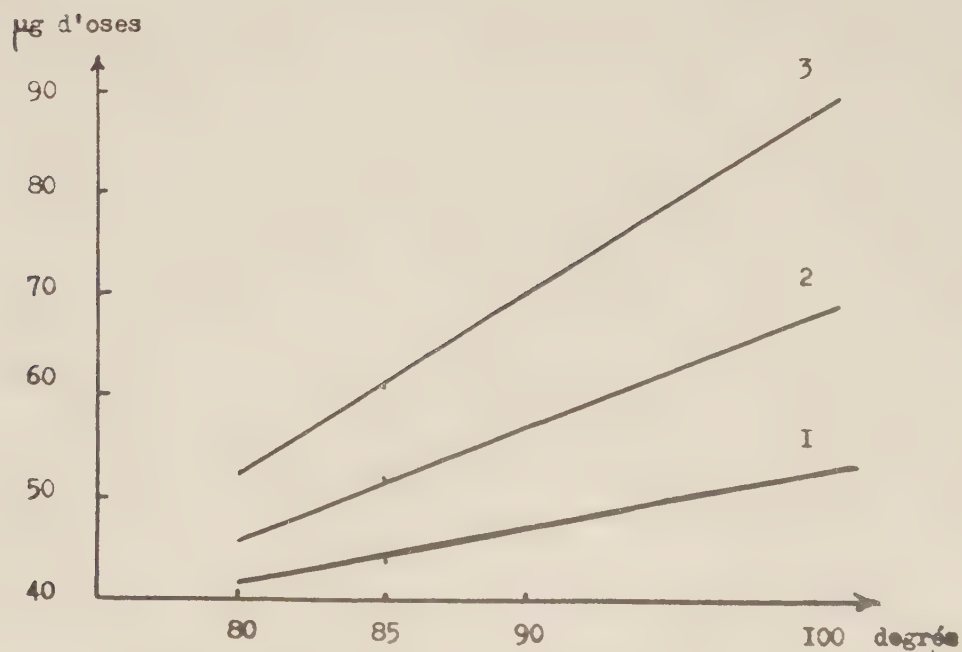


Figure 5. - Dosage des oses libérés de divers échantillons d'haptoglobine après une hydrolyse de 15 minutes, en fonction de la température.

1 : 0,63 mg 2 : 0,83 mg 3 : 1,07 mg de Hp.

2° - Nous plaçant alors à la température constante de 100° nous avons étudié la libération des sucres en fonction du temps. Nous nous sommes adressés à des échantillons de galactose-mannose d'une part et à des échantillons d'Hp d'autre part.

a) -En portant en abscisses les quantités connues d'un mélange galactose-mannose et en ordonnées les densités optiques correspondantes, après des hydrolyses de 15, 20 et 25 minutes, nous obtenons les résultats suivants.

Nous remarquons, pour une durée d'hydrolyse de 20 minutes, que la densité optique n'est plus proportionnelle aux quantités de sucre soumises à l'hydrolyse. Une hydrolyse de 25 minutes détruit une partie des sucres. Par contre, pour une durée d'hydrolyse de 15 minutes, la densité optique est proportionnelle aux quantités de galactose-mannose soumises à l'hydrolyse. (Fig. 6)

b) -En portant en abscisses les durées d'hydrolyse et en ordonnées les densités optiques correspondant aux quantités de sucre libéré à partir de divers échantillons d'Hp, nous obtenons les résultats indiqués sur le graphique suivant. (Fig. 7).

La quantité de sucres libérés à partir de différents échantillons d'Hp est maximum pour un temps d'hydrolyse de 15 mn. En conclusion, pour doser les hexoses contenus dans l'Hp, la durée optimum d'hydrolyse est de 15 minutes et la température de 100°.

c) - Lecture

Après refroidissement des tubes sous l'eau courante, la densité optique est mesurée à 540 mμ. La densité optique des différents échantillons est lue par rapport au tube témoin ne contenant pas d'hexoses.

d) - Résultats

On porte en abscisses les quantités d'hexose et en ordonnées les densités optiques correspondantes. De la densité optique de l'échantillon à doser, on déduit la quantité d'hexose contenue dans l'échantillon.

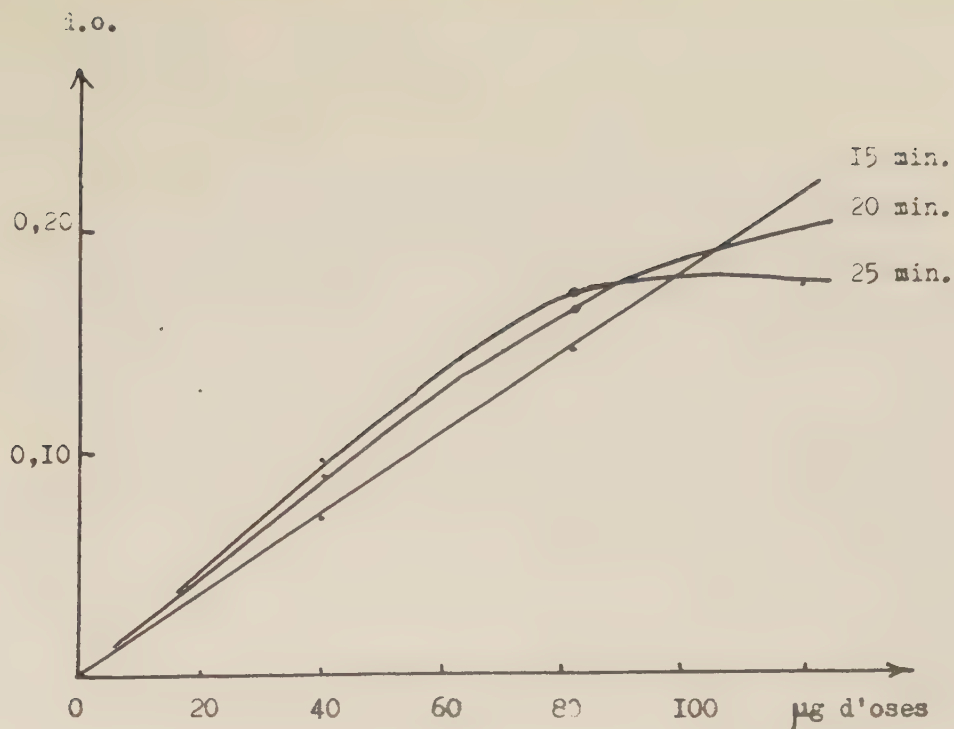


Figure 6. - Dosage des oses après chauffage à 100° d'un mélange de galactose et de mannose pendant des durées variables.

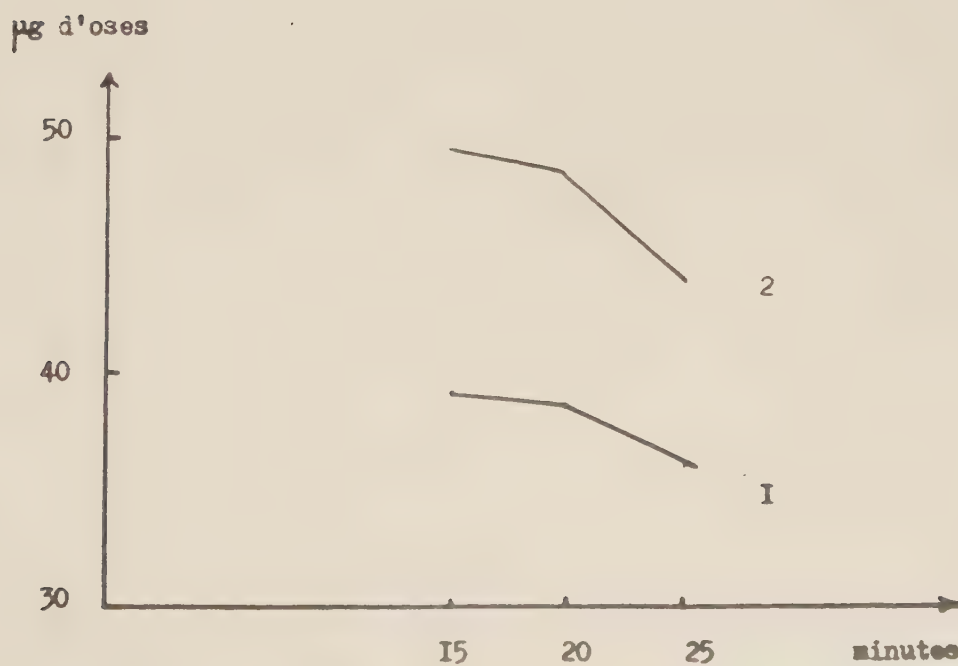


Figure 7. - Dosage des oses libérés de deux échantillons d'haptoglobine après hydrolyse à 100° en fonction du temps.

6° - DOSAGE de l'ACIDE SIALIQUE.

Le dosage de l'acide sialique a été pratiqué suivant la technique de Montreuil (27). L'acide sialique libre donne une coloration bleu violacée avec la diphénylamine. On compare au photomètre l'intensité de la coloration obtenue par action de la diphénylamine sur des quantités croissantes et connues d'acide sialique.

a) -Etablissement de la gamme étalon.

La gamme étalon a été effectuée à partir d'une solution contenant 1 mg d'orosomucoïde/ml. Cet orosomucoïde contient exactement 10% d'acide sialique, le dosage ayant été effectué par rapport à un étalon d'acide N-acétylneurique.

Dans des tubes à essai, on dépose respectivement 0, 0,3, 0,5, 0,7, 1 ml d'une solution contenant 1 mg d'orosomucoïde/ml c'est-à-dire 100 γ d'acide sialique/ml. On complète à 1 ml avec de l'eau bidistillée.

b)- Réaction colorée.

A 1 ml de la solution de glycoprotéine à doser contenant environ 60 γ d'acide sialique ainsi qu'aux différents tubes contenant la solution étalon, on ajoute 3 ml d'acide trichloracétique à 5 % et 6 ml du réactif à la diphénylamine. (Le réactif est préparé de la façon suivante : à 1g de diphénylamine pure, on ajoute 90 ml d'acide acétique glacial et 10 ml d'acide sulfurique Merk). On secoue les tubes, on les bouche et on les plonge 30 minutes au bain-marie bouillant.

Une coloration bleu violacée se développe.

c) - Lecture

Après refroidissement des tubes, la densité optique est mesurée à 530 mu. La densité optique des différents échantillons est lue par rapport au tube témoin ne contenant pas d'acide sialique.

d) - Résultats

On porte en abscisses les quantités d'acide sialique et en ordonnées les densités optiques correspondantes; nous obtenons une droite. De la densité optique de l'échantillon à doser, on déduit la quantité d'acide sialique contenue dans cet échantillon.

DEUXIEME PARTIE

R E S U L T A T S

Nous exposerons successivement les résultats obtenus dans le dosage de la glucosamine, des hexoses et de l'acide sialique.

A - RESULTATS des DOSAGES de GLUCOSAMINE.

1) . . Nous avons déterminé par les méthodes décrites plus haut la teneur en osamine du complexe Hp-Hb choisi pour les raisons déjà indiquées (quantité de sérum trop faible pour préparer l'Hp pure et obtention du complexe à l'état pur plus aisée que celle de l'Hp.)

Les sérums provenaient de femmes atteintes de cancer du sein à différents stades de leur évolution. Ces sérums ont été prélevés au Centre Gustave Roussy de Villejuif. Les malades étudiées n'avaient reçu aucun traitement ni médical, ni chirurgical. Au cours de l'évolution de ces tumeurs, les perturbations métaboliques étaient dûes en pratique uniquement au cancer. Nous avons aussi utilisé des complexes formés à partir de liquides d'ascite de sujets cancéreux. Dans ces conditions, chez ces malades atteints de cancers de sièges divers, peuvent intervenir en outre une dénutrition secondaire (cas des cancers de l'oesophage et de l'estomac). et de l'infection (cas des cancers coliques et utérins). Le tableau n°2 rassemble les résultats obtenus sur des complexes Hp - Hb isolés à partir de 30 sérums; nous avons pu faire ces déterminations au moins en double

TABLEAU II

Taux de glucosamine des complexes Hb - Hp isolés à partir de sérums de sujets atteints de cancer du sein.

NOMS	Quantité de protéines dans la prise d'essai en mg	Quantité de glucosamine dans la prise d'essai en %	Pourcentage de glucosamine	Moyenne. en %
Gas...	0,845	40	4,75	4,55
	1,23	58,5	4,35	
Bar	1,08	35	3,25	3,36
	1,37	45	3,28	
Bou	1,5	61	4,07	4,06
	1,87	76	4,05	
Den	1,13	58	5,15	5,05
	1,41	70	4,96	
Leb	1,21	50	4,13	4,1
	1,04	42	4,05	
Pog	1,57	54,5	3,46	3,25
	1,57	48	3,15	
Fau	1,44	45,5	3,15	3,1
	1,93	59	3,06	
Boi	1,60	61	3,8	3,8
		61	3,8	
Rog	1,20	58,5	4,85	4,85
	1,20	58,5	4,85	

Lar	1, 28	46, 5	3, 64	3, 72
	1, 6	61	3, 81	
Oui	1, 04	56, 5	5, 4	5, 4
		56, 5	5, 4	
Car	1, 07	39	3, 65	3, 65
		39	3, 65	
Che	1, 35	60	4, 45	4, 45
		60	4, 45	
Bay. . .	1, 36	55, 5	4, 08	4, 17
	1, 82	77, 5	4, 26	
Gar	1, 08	44	4, 08	4
	1, 35	53	3, 92	
Jac	1, 32	62	4, 7	4, 78
	1, 60	77, 5	4, 85	
Dev	1, 11	51	4, 6	4, 35
	1, 46	60	4, 1	
Ber	1, 55	62, 5	4, 03	3, 95
	2, 06	80	3, 87	
Lef	2, 04	77	3, 78	3, 78
		77	3, 78	
Che	0, 85	36	4, 21	4, 16
	1, 24	51	4, 12	
Bon.	1, 40	58	4, 14	3, 98
	1, 08	41, 5	3, 82	

Nev	1,58	61	3,86	3,81
	1,26	47,5	3,76	
Bou.	0,96	42	4,36	4,38
	1,20	53	4,4	
Fle	1,35	59,5	4,4	4,5
		62	4,59	
Fau	1,12	54	4,83	4,55
	1,55	66	4,27	
Ler	1,45	58,5	4,02	4,15
		62	4,28	
Cha	1,40	53	3,77	3,77
		53	3,77	
Mar	1,39	56,5	4,05	3,88
	1,86	69	3,71	
Lev	1,40	52	3,72	3,68
	1,86	67,5	3,62	
Pan	1,29	58,5	4,63	4,63
	1,49	68,5	4,63	

Les résultats des dosages de glucosamine effectués sur les complexes formés à partir de liquide d'ascite de cancéreux sont groupés dans le tableau 3.

TABLEAU III

Taux de glucosamine des complexes Hb-Hp isolés à partir de
liquides d'ascite de sujets cancéreux

Noms	Quantité de protéines dans la prise d'essai en mg	Quantité de glucosamine dans la prise d'essai en μ	Pourcentage de glucosamine
Son	1,35	59	4,3
		60	4,4
Cha	1,12	45	4
		47	4,2
Cie	1,5	59	3,9
		57	3,8
Inc	0,94	62	4,0
		47	4,4
Mor	1,54	62	4,0
		65	4,2
Biz	1,1	50	4,5
		51	4,6
Lor	1,03	40,5	3,9
Far	0,99	37	3,7
		37	
Ber	1,27	55	4,3
Per	1,2	48	4
		45	3,8

Le taux de glucosamine contenue dans l'haptoglobine de sujet normal est de 5,4% . Or l'hémoglobine n'apporte pas de glucosamine. Le taux de glucosamine du complexe Hp-Hb est donc de :

$$5,4 \times \frac{100}{168} = 3,25\%.$$

De l'examen des deux tableaux ci-dessus, il ressort que sur les 40 cas étudiés, 38 cas présentent un taux de glucosamine supérieur aux taux normal.

On serait tenté de conclure - et c'est l'hypothèse qui a inspiré ce travail - que l'haptoglobine de cancéreux n'a pas la même composition que l'haptoglobine normale.

TABLEAU IV

Taux de glucosamine dosée sur des échantillons d'Hp de sujet cancéreux.

Noms	Quantité de protéines dans la prise en mg	Quantité de glucosamine dans la prise d'essai en	Pourcentage de glucosamine
Pool	0,915	52	5,7
		50	5,3
	1,25	70	5,6
Son	1,10	62	5,6
	1,10	64	5,7
Cha	0,965	50	5,2
	0,965	48	5
	0,56	32	5,7

Cie	0,60	30	5	
	0,72	42	5,8	5,4
Inc	0,475	28	5,9	
	0 635	35	5,5	
	0,792	42	5,3	5,5
	0,535	29	5,4	
Mor	1,15	58	5	
	1,15	63	5,6	
Biz	0,70	38	5,4	
	0,70	36	5,1	
Lor	0,935	57	5,75	
	0,935	54	5,5	
Far	1,06	55	5,1	
	1,06	56	5	
Ber	0,855	46	5,4	
	0,855	50	5,85	
Per	0,9	50	5,6	
	0 9	51	5 7	

2°)- Pour vérifier cette hypothèse, nous avons préparé de l'Hp pure de cancéreux.

Ne pouvant le faire à partir de faibles quantités de sérums individuels, nous avons constitué un pool de sérums cancéreux et travaillé également sur des liquides d'ascite.

Nous avons préparé l'Hp pure selon les méthodes décrites dans la première partie de ce travail. Nous avons obtenu les résultats suivants (Tableau 4) . De l'examen de ce tableau, il ressort que le taux de glucosamine déterminé directement sur l'haptoglobine de cancéreux est identique à celui de l'Hp normale.

Par contre, si la détermination de ce taux est effectuée sur le complexe Hp-Hb, l'élévation du taux de glucosamine est constante. On est donc conduit à supposer que la présence de l'Hb modifie le dosage de la glucosamine.

TABLEAU V

Comparaison des taux de glucosamine dosée sur des complexes Hb-Hp d'une part et sur de l'Hp d'autre part.

	Quantité d'Hp dans la prise en mg	Quantité de glucosamine dans la prise en γ	Pourcentage de glucosamine
Hp préparée à partir d'un pool de plasma	0,725	38,5 38	5,3
Hp préparé à partir d'un pool de plasma + Hb	0,750	45 50	6,2 6,9

Hp préparé à partir d'un pool de plasma	0,750	40,5 40	5,6 5,6
---	-------	------------	------------

Hp préparée à partir d'un pool de plasma + Hb	0,750	47,5 51,5 49 51,5	6,5 7,1 6,9 7,1
---	-------	----------------------------	--------------------------

3°)- Pour vérifier cette hypothèse, nous avons dosé la glucosamine d'un échantillon d'Hp pure et refait cette mesure en présence d'une quantité d'hémoglobine égale à celle nécessaire pour former le complexe.

En rapportant les quantités trouvées à la quantité d'Hp de l'échantillon, nous obtenons les résultats suivants (Tableau 5) . Ainsi donc l'addition d'Hb à Hp avant hydrolyse modifie le dosage colorimétrique de la glucosamine. Comment interpréter ce fait. ?..... La détermination du taux de glucosamine l'hydrolysât de l'Hb ne donne qu'un "témoin" très peu coloré ; nous l'avons montré.

Lors de la formation du complexe, l'addition de l'Hb à l'Hp fait passer la teneur en sucre de 22 % à 13 %. Elle diminue donc presque de moitié ; ou encore, pour un même poids de sucres, le poids de protéines a presque doublé. On est en droit de s'attendre à ce qu'au cours de l'hydrolyse, les interactions entre les acides aminés et les produits de dégradation des sucres ne soient plus du tout les mêmes. Entre les sucres et certains acides aminés, il existe des complexes qui réagissent avec la paradiméthylaminobenzaldehyde (Immers et Vasseur (28) .

La coloration avec la paradiméthylaminobenzaldehyde peut être augmentée par des substances à noyau pyrrol ou indol présentes dans l'échantillon ou formées à partir des sucres ou aminoacides.

En conclusion, la différence entre le taux de glucosamine mesuré directement sur l'Hp et celui mesuré sur le complexe est due à une perturbation du dosage colorimétrique.

B. - RESULTATS des DOSAGES des SUCRES

Instruits par l'expérience précédente, nous n'avons pas déterminé le taux des hexoses de l'Hp sur le complexe Hp-Hb. La présence de l'hémoglobine modifie la coloration due aux hexoses à la longueur d'onde de 540 mu. La méthode à l'orcinol n'eût pas été applicable au complexe Hp-Hb.

Nous avons donc dosé les hexoses sur de l'haptoglobine de cancéreux obtenue à partir d'un pool de sérum et à partir de liquide d'ascite.

TABLEAU VI

Taux des hexoses dosés sur des échantillons d'Hp de sujets cancéreux.

Noms	Quantité d'Hp dans la prise en mg	Quantité d'hexoses dans la prise en γ	Pourcentage en hexoses	Moyenne en %
Hp obtenue à partir d'un pool de plasma	1,0	84	8,4	8,5
	1,0	87	8,7	
Son	0,987	80	8,5	8,6
	0,658	60	9,1	
	1,31	109	8,3	
Cha	1,28	102	8	9,3
	1,33	134	10	
	1,06	108	10	
Cie	1,05	85	8,2	8
	1,05	82	7,9	
	0,95	77	8,1	

Inc	0,95	78	8,2	
	1,27	100	7,9	
	1,27	108	8,5	8,3
	1,12	95	8,5	
	1,12	95	8,5	
Mor	1,13	115	10,1	
	1,13	118	10,4	10,25
Biz	1,65	134	8,1	
	1,65	132	8	8,05
Lor	1,4	116	8,3	
	0,70	60	8,5	8,3
	1,4	112	8	
Far	1,13	105	9,3	
	0,85	78	9,2	9,25
Ber	0,96	78	8,0	
	1,29	105	8,1	8,05
Per	0,88	69	7,8	
	1,22	100	8,2	8

Nous avons obtenu les résultats suivants (Tableau 6) . Nous voyons que la moyenne du taux des hexoses de l'Hp isolée à partir de sérum ou de liquide d'ascite de sujets cancéreux est de 8,6% . Or, nous avons trouvé que le taux d'hexoses de l'haptoglobine isolée à partir de sérums normaux, se situait aux environs de 8,8,5 % dans les conditions d'hydrolyse décrites précédemment (Hydrolyse de 15 à 100°).

Il n'existe donc pas, quant à la composition quantitative des hexoses, de différence entre l'Hp des sujets cancéreux et celle des sujets normaux.

C. - RESULTATS des DOSAGES de l'ACIDE SIALIQUE

Sur de l'Hp isolée à partir d'un pool de plasma fourni par le Centre National de Transfusion Sanguine, nous avons trouvé un taux d'acide sialique de 6,5%.

Sur un autre échantillon d'Hp purifié de manière différente, nous avons trouvé un taux de 5,5% . Les chiffres donnés par Herman-Boussier sont de 6,3 % pour l'Hp I et 4,95 pour l'Hp II. Dans tous ces cas, l'acide sialique est dosé par la méthode à la diphénylamine.

TABLEAU VII

Taux de l'acide sialique dosé sur des échantillons d'Hp de sujets cancéreux

Noms	Quantité d'Hp contenue dans la prise en mg	Quantité d'acide sialique contenue dans la prise en %	Pourcentage en acide sialique	Moyenne
Hp isolée à partir d'un pool de plasma	0,90	60	6,7	6,6
	0,90	58	6,5	
Son	1,09	68	6,2	6,4
	1,09	72	6,6	
	0,877	56	6,4	
Cha	1,0	59	5,9	6,1
	1,0	63	6,3	
Cie	1,1	64	5,8	5,8
	1,1	64	5,8	
Inc	1,04	55	5,3	5,5
	0,795	45	5,7	
Mor	0,99	66,5	6,7	6,6
	0,99	66	6,7	
	0,97	62	6,3	
	0,97	65	6,6	

Biz	1, 13	70	6, 2	6, 3
	1, 13	72	6, 4	
Lor	0, 95	53	5, 6	5, 85
	0, 95	58, 5	6, 1	
Far	1, 16	76	6, 5	6, 75
	1, 16	76	6, 5	
	1, 16	81	7	
	1, 16	81	7	
Ber	1, 16	74	6, 3	6, 2
	1, 45	88	6, 1	
Per	1, 24	72	3, 8	6, 15
	1, 24	81, 5	6, 5	

Nous avons dosé l'acide sialique sur l'Hp obtenue à partir d'un pool de sérums de cancéreux et de divers liquides d'ascite. Nous avons obtenu les resultats suivants (Tableau 7). Etant donné les erreurs expérimentales du dosage et le fait que tous nos échantillons ne sont pas rigoureusement purs, nous ne pensons pas qu'il y ait de différence quantitative dans la teneur en acide sialique entre l'Hp des sujets normaux et celle des sujets cancéreux .

R E S U M E e t C O N C L U S I O N S

Ce travail a été entrepris afin d'établir si l'haptoglobine de cancéreux avait la même composition que l'haptoglobine de sujet normal.

Comme il ne saurait être question, pour le moment du moins, de déterminer la composition et la structure de la partie protéique d'une aussi grosse globuline (p. m. = 100.000), nous avons étudié simplement les modifications possibles de la partie glucidique.

Dans un premier temps, nous avons travaillé sur le complexe Hb-Hp, plus facile à obtenir à l'état pur que l'haptoglobine. Sur ce complexe, nous avons déterminé le taux de glucosamine et nous avons trouvé que ce taux était augmenté. Mais cette augmentation n'était qu'apparente puisque le dosage de la glucosamine sur de l'haptoglobine de sérum de cancéreux donnait un taux identique à celui de l'haptoglobine de sujet sain. Nous avons pensé que cette augmentation apparente était due à l'apport par l'hémoglobine d'acides aminés réagissant avec les réactifs pour donner des produits colorés faussant la réaction.

C'est pourquoi, par la suite, avons-nous travaillé sur de l'haptoglobine isolée à partir d'un pool de sérum de cancéreux ou de divers liquides d'ascite.

Sur divers échantillons, nous avons dosé les hexoses, et nous avons constaté qu'il n'existait pas de modification quantitative dans la teneur en sucres de l'haptoglobine de sujets cancéreux, par rapport à celle de l'haptoglobine de sujets normaux.

Comme 70% de l'acide sialique occupe une position terminale dans la structure de l'haptoglobine, nous étions en droit de penser que le cancer modifiait peut être la partie périphérique de la protéine sans toucher aux oses et à la glucosamine plus intimement liés aux chaînes peptidiques et plus fortement incorporés dans la molécule. Pour cette raison, nous avons dosé l'acide sialique de l'haptoglobine. Nous n'avons pas trouvé de différence appréciable entre la teneur en acide sialique de l'haptoglobine de sujet cancéreux et de l'haptoglobine de sujets normaux.

En conclusion, par une série de dosages effectués sur de nombreux sérums et liquides d'ascite, nous n'avons jamais pu mettre en évidence de modifications significatives dans la composition de l'haptoglobine de cancéreux en oses, osamine et acide sialique.

B I B L I O G R A P H I E

1. - LOEPER (J.) La protéinémie souvent paradoxale du sérum des cancéreux.
Bull. Acad. Méd. 1952, 136, 578.
2. - JURET (P.) Etude de la formule protéinique des cancers du sein.
Bull. du cancer, 1957, 44, n°1.
3. - WARREN (F.) The value of glycoprotein determination and cytology in
the study of ascitic fluid.
Gastreenterology, 1959, 37, n°3 .
4. - KAWASAKI (H.) Molish positive mucopolysaccharides of gastric cancers
are compared with the corresponding components of gastric mucosae.
Tohoku J. Exper. Med. 1958, 68, n°2, 119.
5. - TURUMI (K.)
Fukushima J. Med. Sci. 1956, 3, 31
6. - TURUMI (K.), TAKAHASHI (S.) and SAITO (Y.)
Fukushima J. Med. Sci. 1956, 3, 47.
7. - TAKAHASHI (S.)
Fukushima (J. Med. Sci., 1956, 3, 47
8. - PUTNAM (F.) Globulines anormales du sérum humain.
J. Biol. Chem. 1958, 233, n°6, 1448.
9. - JAYLE (M. F.) Sur la constitution, le mécanisme d'action, le rôle biolo-
gique des peroxydases et des catalases.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1941, 23, 162.
10. - POLONOVSKI (M.) et JAYLE (M. F.) Existence dans le plasma humain
d'une substance activant l'action peroxydasique de l'hémoglobine.
C. R. Soc. Biol. 1938, 129, 457.
11. - POLONOVSKI (M.) et JAYLE (M. F.) Sur la préparation d'une nouvelle
fraction des protéines plasmatiques, l'haptoglobine.
C. R. Ac. Sc. 1940, 24, 517.

12. - JAYLE (M. F.) , VIALATTE (S.) , LAGRUE (G.) et BOUSSIER (G.)
J. Urol. Méd. Chir. 1953, 59, 800.
13. - JAYLE (M. F.) et BOUSSIER (G.)
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36 , 959.
14. - BOUSSIER (G.) , MORETTI (J.) et JAYLE (M. F.) Propriétés physiques
et chimiques des haptoglobines des types I et II et de leurs com-
plexes avec l'hémoglobine.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1960, 42, 837.
15. - SMITHIES (O.) Zone electrophoresis in starch gels ; groups variations
in the serum proteins of normal human adults.
Biochem. J. 1955, 61, 629.
16. - SMITHIES (O.) et WALKER (N. F.) Notation for serum protéine groups
and the genes controlling their inheritance.
Nature 1956, 178, 694.
17. - HERMAN-BOUSSIER (G.) , MORETTI (J.) et JAYLE (M. F.) Etude
de l'Hp : Préparation des Hp I et II.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1960, 42 , 817.
18. - LAURELL (C. B.) Purification and properties of different haptoglobines.
Clin. Chim. Acta 1959, 4, 79
19. - BOURILLON (R.) et GOT (R.) Technique et appareil d'électrophorèse
de zone sur amidon.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1955, 37, 915.
20. - JAYLE (M. F.) , BOUSSIER (G.) et TONNELAT (J.) Isolement à partir
du sérum humain de la combinaison Hp-Hb à l'état homogène.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 38, 343.
21. - DONALDSON, SISSON KING, WOOTLON and MAC FARLAN. Deter-
mination of haemoglobin standardised optical data for absolute
estimation.
Lancet 21 avril 1951, p. 874.
22. - JAYLE (M. F.) Méthode de dosage de l'Hp sérique.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 876.

23. - ELSON (A. L.) and MORGAN (W. T.) A colorimetric method for determination of glucosamine and chondrosamine.
Biochem. J. 1933, 27, 1824.
24. - BLIX (G.) Determination of hexosamines according to Elson and Morgan.
Acta Chem. Scand. 1948, 2, 467
25. - LUSTIG (B.) et LANGER (A.)
Biochem Z. 1931, 242, 320, 171.
26. - WERMER (H.E.) et MOSHIN (J. R.)
Am. Rev. tuberculosis 1952, 68, 594, (170)
27. - MONTREUIL (J.) Les glycoprotéides. IVème Journées biochimiques Montpellier 1957 (177)
Bull. Soc. Chim. Biol. Supplt. III, 1957.
28. - IMMERS (J.) et VASSEUR (E.) Interaction of aminocompound, with monosaccharides. A spectrophotometric study of the color with Ehrlich's reagent.
Acta Chem. Scand. 1952, 6, 363,
-
-
-

Vu le Président de Thèse

Professeur M. F. JAYLE

Vu le Doyen de la Faculté

de Médecine de Paris

Vu et Permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE.

